



INMUNODIAGNÓSTICO DE LA TRICOMONOSIS POR ENSAYOS TIPO ELISA USANDO LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TvCP65 y TvPFO DE *Trichomonas vaginalis*

Claudia Flores Pucheta¹, Daniel Morales-Mora², Patricia Meza-Cervantes², Rossana Arroyo² y Jaime Ortega-López¹
¹Biotecnología y Bioingeniería, ²Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN, México D. F. CP 07360
cflores@cinvestav.mx

Palabras clave: Inmunodiagnóstico, cistein-proteinasa, pyruvate ferredoxin oxidorreductase

Introducción. La tricomonosis es una infección de transmisión sexual (ITS) causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, con una incidencia anual de 170 millones de casos y que afecta principalmente a mujeres. En México es el segundo lugar de las ITS con una prevalencia mayor a 32 mil casos anuales (1,2). Muchos de los casos son asintomáticos y aunado a que los métodos actuales para el diagnóstico de la tricomonosis no permiten establecer un resultado rápido y confiable dificulta el tratamiento adecuado de esta ITS (3). Esto ha obligado a recurrir a técnicas inmunológicas y moleculares que permitan detectar el antígeno, anticuerpo o material genético del parásito en suero o en secreciones vaginales o prostáticas de pacientes infectados forma más eficiente y económica. Estudios previos demostraron que varias proteínas como la TvCP65 y la TvPFO de *T. vaginalis* son inmunogénicas y anticuerpos contra estas proteínas se encuentran en suero y lavados vaginales de pacientes infectados (4, 5) sugiriendo su potencial para el inmunodiagnóstico de la tricomonosis.

El objetivo de este trabajo fue expresar y purificar las proteínas recombinantes TvCP65 y PFO de *T. vaginalis*, para su uso como antígenos en ensayos tipo ELISA de sueros de pacientes con vaginitis.

Metodología. Cepas de *E. coli* BL21 transformadas con las construcciones *pColdI-Tvcp65* o *pColdI-PFO1.1*, se cultivaron en medio TB a 37° C y 200 rpm. La expresión de las proteínas recombinantes se indujo con IPTG 1 mM cuando la DO_{600nm} alcanzó 0.6 Después de 20 h se colectó la biomasa y la proteína recombinante se recuperó de la fracción insoluble. Los cuerpos de inclusión (CI) se solubilizaron con urea 8 M y en condiciones desnaturalizantes se purificaron por cromatografía de afinidad a Ni (Ni-Sepharose, GE-Healthcare). Las fracciones obtenidas en cada etapa se analizaron por SDS-PAGE. Ambas proteínas se dializaron contra el amortiguador respectivo (TvCP65r en PBS 1x, pH 7.4 y TvPFOr en PBS1x/100mM KCl, pH 7.4), se liofilizaron y almacenaron a -20° C hasta su uso en los ensayos de ELISA. Los ensayos de ELISA se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano (0.5 µg proteína/pozo). Los sueros de pacientes se usaron 1:500 y como anticuerpo secundario se usó el conjugado anti-IgG de humano acoplado a HRP. Después se incubaron

las placas con el sustrato cromogénico y se leyeron en un lector de ELISA a 492 nm.

Resultados. Ambas proteínas recombinantes, TvCP65r y TvPFOr, se localizaron en la fracción insoluble como CI (Fig. 1, carriles FI) y con un solo paso de purificación (Fig. 1, carriles P) se alcanzó la pureza deseada con rendimientos de 19.72 y 86.54 mg/L, respectivamente. En los ensayos de ELISA se observó una diferencia notable entre los sueros de pacientes con vaginitis y los de personas sanas al usar TvCP65r y TvPFOr como antígenos. Además la PFOr presentó mayor reactividad en comparación con la TvCP65r. Es necesario continuar el estudio con un mayor número de muestras para establecer valores finales de sensibilidad y especificidad.

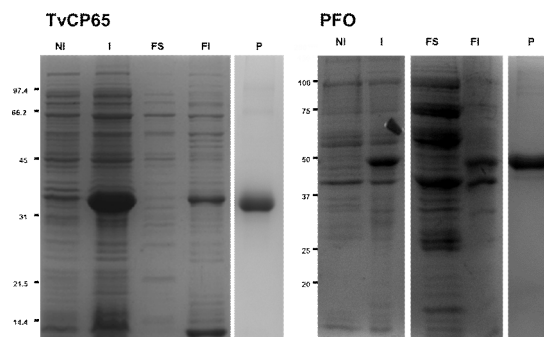


Fig. 1. Expresión y purificación de TvCP65r y PFOr. SDS-PAGE al 10%. NI No inducido, I Inducido, FS Fracción soluble, FI Fracción insoluble y P Proteína purificada.

Conclusiones. La TvCP65 y PFO recombinantes funcionan favorablemente como antígenos para el inmunodiagnóstico de la tricomonosis por ensayos de ELISA.

Agradecimiento. Agradecemos el apoyo del CINVESTAV y el financiamiento del proyecto ICYTDF 299 (RA).

Bibliografía.

1. Arroyo R. y Ortega J. (2006) Tricomonosis. En: *Aprendizaje de la parasitología*. Flisser A. ETM, México. 303-320
2. Radonjic, I., Dzamic, A., Mitrovic S., et. al. (2006) *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 126:116-120
3. Petrin D., Delgaty K., Bhatt R. and Garber G. (1998) *Clin. Microbiol. Rev.* 11(2): 300-317
4. Álvarez M., Ávila L., Becerril C., et. Al.(2000). *Microb Phatog.* 28: 193-202.
5. Moreno V., Yañez C., Meza P., et. al. (2005). *Cellular Microbiology* 7: 245-258.